

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
22 janvier 2004 (22.01.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/007522 A2

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : C07J 41/00, A61K 31/565, A61P 15/04, 15/06, 15/12, 9/12
- (74) Mandataire : BUREAU D.A. CASALONGA-JOSSE; 8, avenue Percier, F-75008 Paris (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002152
- (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Date de dépôt international : 9 juillet 2003 (09.07.2003)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
02/08619 9 juillet 2002 (09.07.2002) FR
- (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : EFFIK [FR/FR]; Batiment 24, Parc Burospace, F-91572 Bievres (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : GRASSET, Etienne, Alfred, Robert [FR/FR]; 54, passage Les enfants du paradis, F-92100 Boulogne-Billancourt (FR). MENDEZ, Félix [ES/ES]; Fernando Catolico 77, E-28028 Madrid (ES). PAVAN, Carlo [FR/FR]; 26-28, grande rue Charles de Gaulle, F-94130 Nogent sur Marne (FR). TERRACOL, Didier [FR/FR]; 4, allée des Lauriers, F-91370 Verrières le Buisson (FR).
- Publiée :
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

WO 2004/007522 A2

(54) Title: HORMONE-BASED NITROGEN MONOXIDE DONOR COMPOUNDS AND USE THEREOF IN OBSTETRICS AND GYNECOLOGY

(54) Titre : COMPOSÉS A BASE D'HORMONE DONNEURS DE MONOXYDE D'AZOTE ET LEUR UTILISATION EN OBSTÉTRIQUE ET EN GYNÉCOLOGIE

(57) Abstract: The invention concerns compounds capable of being fixed on hormone receptors and having a nitrogen monoxide donor group, their use for preventing premature births, increasing cervical dilatation, for use in hormone substitution therapy as anti-hypertensive drug and their therapeutic use for preparing a medicine for use in obstetrics and gynecology.

(57) Abrégé : La présente invention concerne des composés capables de se fixer à des récepteurs d'hormones et possédant un groupement donneur de monoxyde d'azote, leur utilisation pour prévenir des naissances avant terme, augmenter à terme la dilatation du col de l'utérus, être utilisé dans le cadre d'une thérapie substitutive hormonale ou en tant qu'anti-hypertenseur et leur application thérapeutique pour la préparation d'un médicament utilisable en obstétrique et en gynécologie.

**Composés à base d'hormone donneurs de monoxyde d'azote
et leur utilisation en obstétrique et en gynécologie**

5 La présente invention concerne des composés capables de se fixer à des récepteurs d'hormones et présentant un groupement ester nitrique donneur de monoxyde d'azote, leur utilisation pour prévenir des naissances avant terme, augmenter la dilatation du col de l'utérus à terme, dans le cadre d'une thérapie substitutive hormonale ou en tant qu'anti-hypertenseur et leur application thérapeutique pour la préparation d'un médicament utilisable en obstétrique et en gynécologie.

10

Les naissances avant terme demeurent relativement communes, représentant de 5 à 10 % de toutes les grossesses. Cette proportion n'a pas évolué dans les 20-30 dernières années.

15

Une sécrétion adéquate de progestérone est en fait nécessaire au maintien de la grossesse jusqu'à terme. La progestérone est une hormone initialement sécrétée par le corpus luteum ou corps jaune dans l'ovaire puis par le placenta. L'inhibition de la contractilité utérine par la progestérone ou les dérivés de la progestérone a été démontrée en utilisant des modèles animaux pharmacologiques.

20

L'administration de progestérone durant le troisième trimestre de la grossesse afin de prévenir une délivrance avant la maturité de l'enfant a déjà été évoquée il y a plus de 20 ans. De ce fait, la progestérone micronisée a été administrée de façon très commune en France à des doses orales élevées (le plus souvent au moins 600 mg par jour) à des femmes afin d'éviter un accouchement prématuré. Cette utilisation a cependant été arrêtée à la suite d'un risque de toxicité hépatique lié au traitement. De plus, ce traitement n'avait pas en fait d'incidence vraiment prouvée sur le poids de naissance et l'âge de gestation des enfants.

25

Il a été montré très récemment qu'un traitement par injection hebdomadaire d'un dérivé de la progestérone permettait, chez des femmes à très haut risque, de réduire la fréquence des accouchements prématurés et de diminuer la fréquence de certaines complications chez leurs enfants [Meis PJ, Klebanoff M, Thom E et Coll. Prevention of recurrent preterm delivery by 17 alpha-hydroxyprogesterone caproate. N Engl J Med 2003;348:2379-85]

30

Le monoxyde d'azote a récemment été identifié comme étant un modulateur important de la fonction cellulaire. Il a un effet relaxant puissant sur les cellules du muscle lisse. En fait, le trinitrate de glycérite était utilisé depuis de nombreuses années pour soigner les symptômes d'angine de poitrine bien avant qu'on connaisse son mécanisme d'action (le trinitrate de glycérite est un donneur de monoxyde d'azote).

Le muscle de l'utérus, le myomètre, contient également des cellules musculaires lisses. La monoxyde d'azote synthase, l'enzyme qui synthétise le monoxyde d'azote, a ainsi un effet relaxant sur les cellules musculaires du myomètre de l'utérus et du col de l'utérus. Le monoxyde d'azote augmente également le flux sanguin utérin pendant la grossesse.

In vivo, l'inhibition de la production de monoxyde d'azote provoque une parturition avant terme chez les cobayes gestantes. Inversement, l'application locale à terme sur le col de l'utérus de nitroprusside de sodium, qui est un donneur de monoxyde d'azote, augmente la dilatation cervicale. Ceci montre que le monoxyde d'azote peut avoir deux effets différents, au niveau du corps de l'utérus, et au niveau du col. L'inhibition de la contraction de l'utérus relaxe le corps de l'utérus et peut prévenir un accouchement prématuré, avant terme. Lorsque le terme est atteint, l'induction d'un ramollissement et d'une dilatation du col peut aider à la progression de l'accouchement.

Les groupements donneurs d'acide nitrique tels que le trinitrate de glycérite ont ainsi été évalués chez la femme pour tester l'induction de la relaxation utérine. Des patientes dont l'état nécessitait une tocolyse urgente pour rétention placentaire, pour des problèmes d'extraction fœtale difficile ou pour inversion utérine aiguë ont été traitées avec une dose initiale intraveineuse de 50 à 500 microgrammes de nitroglycérine avec des bolus répétés à intervalles de 60 à 90 secondes.

Malgré l'efficacité de ce traitement, on a noté dans 41 % des cas la survenue d'une hypotension transitoire en dépit d'une hydratation intraveineuse [O'Grady JP, Parker RK, Patel SS. Nitroglycerin for rapid tocolysis: development of a protocol and a literature review. *J Perinatalol* 2000;1:27-33].

L'administration de nitroglycérine grâce à un timbre transdermique capable de délivrer 0,4 mg/heure de nitroglycérine a été testée sur un total de 33 femmes présentant un travail avant terme et comparée à un placebo. Ces femmes ont reçu une administration prophylactique en intraveineuse de 1000 ml d'une solution saline à 0,9 % pendant 1 à 2 heures pour éviter l'hypotension induite par la nitroglycérine. Les

femmes qui ont reçu la nitroglycérine ont moins d'accouchement dans les 48 heures. Cependant, l'effectif était trop faible pour être interprétable au niveau statique.

5 Une étude plus importante a comparé l'efficacité du trinitrate de glycérile transdermique par des timbres de 10 ou 20 mg à une injection de ritodrine en intraveineuse afin d'éviter une délivrance avant terme. Les résultats obtenus montrent que l'efficacité de ces deux traitements est similaire [Lees CC, Lojacono A, Thompson C, Danti L, Black RS, Tanzi P et al. *Glyceryl trinitrate and ritodrine in tocolysis: an international multicenter randomized study. Obstet Gynecol* 1999;94:403-8]. L'effet indésirable le plus courant observé avec la ritodrine était une tachycardie; pour 10 le trinitrate de glycérile, c'étaient les maux de tête.

Le brevet WO 95 13802 décrit l'utilisation d'un substrat de la monoxyde d'azote synthase et/ou d'un donneur de monoxyde d'azote avec différents composés dont un progestatif afin d'inhiber la contraction utérine ou un inhibiteur de monoxyde d'azote avec un antagoniste de la progestérone afin de stimuler la contractilité utérine.

15 Le brevet US 5 895 783 décrit l'administration simultanée de trois composés, un progestatif, un substrat de la synthase d'acide nitrique ou un donneur d'oxyde nitrique et différents composés à vocation anti-inflammatoire tels que les inhibiteurs de cyclo-oxygénase chez des femmes présentant une éclampsie avec ou sans travail avant terme.

20 La nitroglycérine, l'arginine et la progestérone sont administrées dans des compositions séparées. Mais le dosage de progestérone doit être très élevé pour équivaloir à une quantité de 50 à 300 mg de progestérone injectée.

Le brevet US 5 595 970 décrit l'utilisation d'un substrat de monoxyde d'azote et/ou d'un donneur d'oxyde nitrique seul ou en combinaison avec un progestatif, un 25 œstrogène ou les deux pour tempérer la survenue des symptômes liés à la ménopause. Dans ce cas, la quantité de progestatif est équivalente à une dose de 50 à 300 mg de progestérone injectée, ce qui est extrêmement élevé.

Le brevet US 6 040 340 décrit une méthode pour améliorer le taux de grossesse par administration d'un substrat de monoxyde d'azote et/ou d'un donneur 30 d'oxyde nitrique seul ou en combinaison avec un progestatif et de façon optionnelle, avec un œstrogène ou une méthode contraceptive. Là encore, une dose très élevée de progestatif a été utilisée.

Le brevet US 6 028 106 décrit une méthode similaire pour relaxer le détroit vésical et traiter l'incontinence urinaire.

5 Le brevet WO 98 09948 décrit l'utilisation de composés dérivés de l'oxyde nitrique qui peuvent relaxer le muscle lisse et aider à contrôler l'incontinence urinaire et d'autres pathologies qui incluent la délivrance avant terme. Une combinaison d'un groupement capable de relarguer du monoxyde d'azote avec des corticostéroïdes a été considérée seulement dans le but d'augmenter les propriétés anti-inflammatoires de ces corticoïdes.

10 La demanderesse a découvert une famille de composés capables de se fixer à des récepteurs d'hormones et comportant un groupement ester nitrique donneur de monoxyde d'azote à l'exception de l'estradiol substitué en position 11 et/ou 17 par un groupement ester nitrique. Elle a découvert que ces composés exerçaient une action thérapeutique dans la prévention de naissances prématurées, dans le contrôle de la mobilité utérine, dans l'augmentation de la dilatation cervicale lors de l'étape du travail, dans les anomalies de la contraction utérine, dans les dysménorrhées, dans le traitement hormonal de substitution des femmes ménopausées, dans l'induction d'un cycle endométrial dans le cadre de la reproduction assistée et dans la prévention de l'hypertension.

20 L'invention a donc pour objet des composés capables de se fixer à des récepteurs d'hormones et comportant un groupement ester nitrique donneur de monoxyde d'azote à l'exception de l'estradiol substitué en position 11 et/ou 17 par un groupement ester nitrique.

Les récepteurs d'hormone sont choisis parmi des récepteurs stéroïdes, rétinoïdes et de dérivés de la vitamine D.

25 Les composés préférés selon l'invention, capables de se fixer à des récepteurs d'hormone peuvent être des hormones naturelles ou synthétiques agissant comme agoniste ou antagoniste après fixation sur le récepteur hormonal approprié comportant un ou plusieurs groupements ester nitrique. Les composés selon l'invention se fixent aux tissus riches en récepteur hormonal. La présence de ces groupements au sein de ces molécules offre plusieurs avantages :

- 30
- modifications de propriétés physicochimiques de ces molécules avec, par exemple, amélioration de la solubilité dans l'eau des molécules les moins polaires,
 - modification du métabolisme de ces molécules,
 - possibilité délivrance du monoxyde d'azote au sein des tissus.

Ces hormones sont de préférence des progestatifs, des œstrogènes, des anti-minéralocorticoïdes, des androgènes, des anti-androgènes ou une combinaison de ces hormones.

5 Ces hormones sont choisies plus particulièrement parmi la progestérone, la 17OH progestérone, l'estradiol, l'éthinyl estradiol, l'aldostérone, la spironolactone, la drospirénone, la testostérone et la cyprotérone.

Ces hormones comportent au moins un ou plusieurs groupements ester nitrique donneur de NO.

10 De préférence, le composé comporte un ou plusieurs groupements NO₂ lié(s) à l'hormone directement par l'atome d'oxygène de la forme énolique ou par l'intermédiaire d'un radical benzyloxy.

De préférence, l'hormone capable de se fixer à des récepteurs d'hormones est la progestérone ou la 17OH progestérone comportant un ou plusieurs groupements NO₂ lié(s) directement ou par l'intermédiaire d'un radical benzyloxy.

15 En particulier, lorsque le ou les groupements NO₂ sont liés directement à l'hormone, la liaison se fait par l'atome d'oxygène de la forme énolique de celle-ci par exemple en position 3 de la progestérone ou en position 17 de la 17OH progestérone.

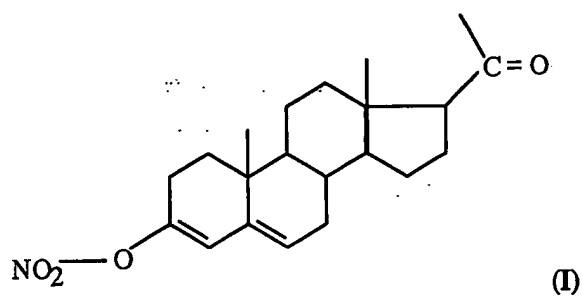
20 Lorsque le ou les groupements NO₂ sont liés par l'intermédiaire d'un radical benzyloxy à l'hormone, cette liaison se fait soit directement à l'hormone, soit par l'intermédiaire d'un groupement établissant un pont, tel qu'un groupement C=O ou COO, à l'atome d'oxygène de la forme énolique de l'hormone ou directement sur le cycle tel que par exemple en position 3 de la progestérone ou en position 3 et/ou 17 de la 17OH progestérone.

25 Les composés selon l'invention peuvent comporter des groupements NO₂ liés en l'une des positions directement à l'hormone et en l'autre position liés par l'intermédiaire d'un groupement benzyloxy.

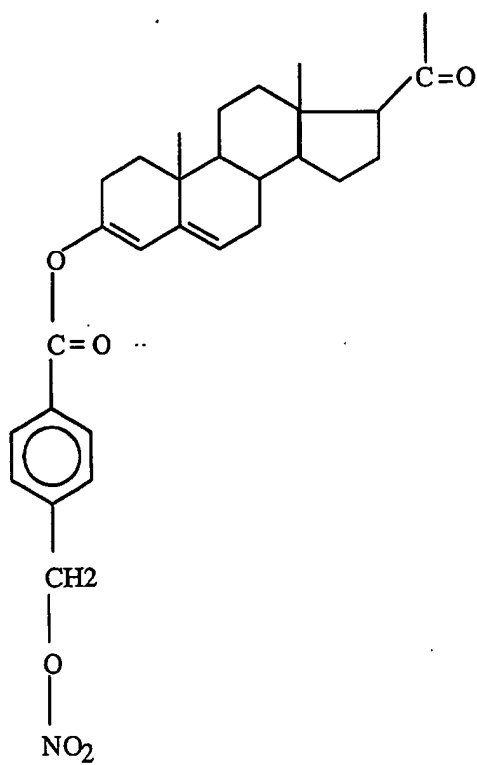
Ces hormones peuvent être de formule suivante :

30

6

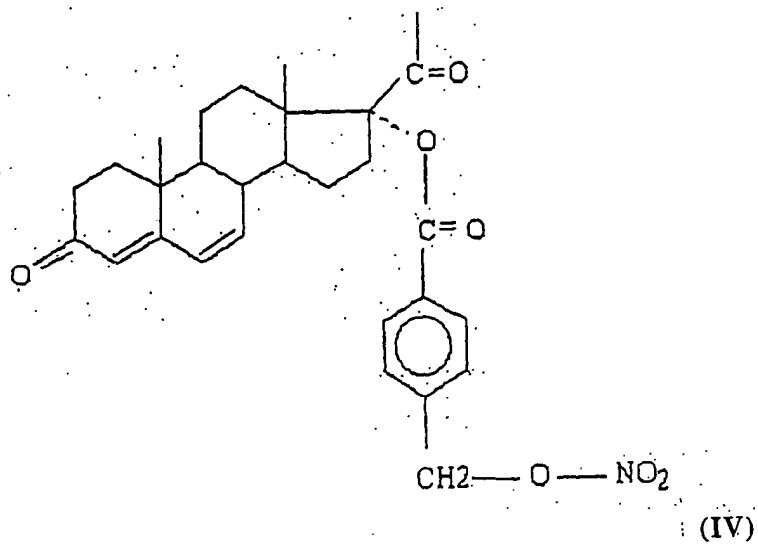
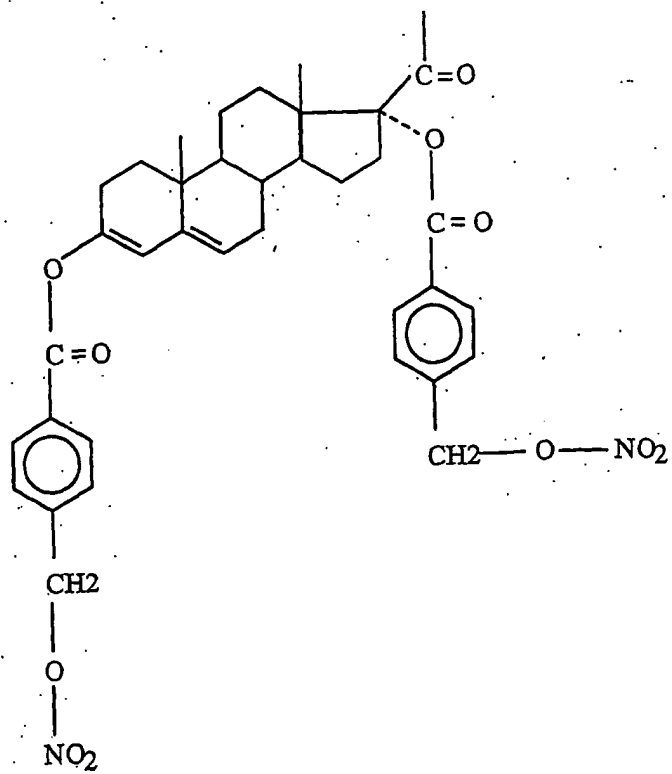


(I)



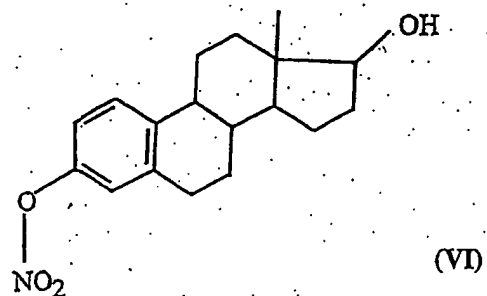
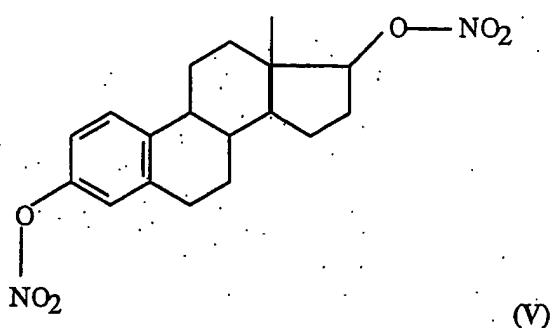
(II)

5



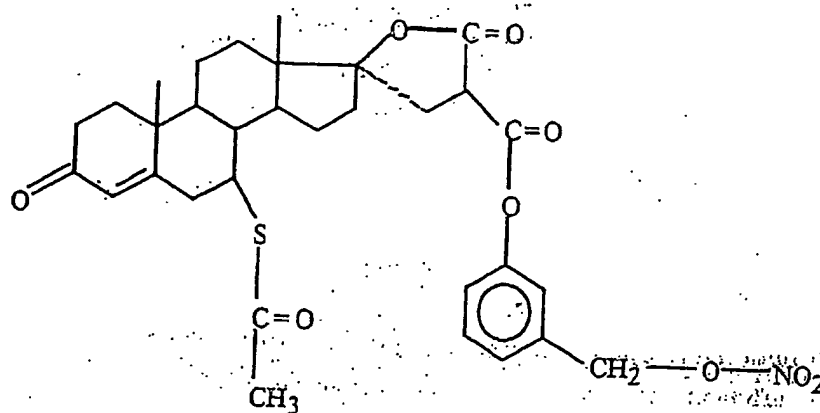
Dans un autre mode de réalisation de l'invention, l'hormone capable de se fixer à des récepteurs d'hormones est l'estradiol comportant en 17 et en 3 de l'estradiol ou en 3 de l'estradiol un groupement NO_2 lié à l'atome d'oxygène.

Ces hormones peuvent être de formule suivante :



Dans un autre mode de réalisation de l'invention, l'hormone capable de se fixer à des récepteurs d'hormones est la spironolactone comportant un groupement NO_2 lié par l'intermédiaire d'un radical benzoyloxy à l'hormone, de préférence par l'intermédiaire d'un groupement carboxylate.

Ces hormones peuvent être de formule suivante :



(VII)

5

Il a été découvert que les composés de la présente invention définis ci-dessus y compris l'estradiol substitué en position 11 et/ou 17 par un groupement ester nitrique sont utilisables dans la prévention des naissances avant terme, dans le contrôle de la mobilité utérine et dans l'augmentation de la dilation du col de l'utérus au moment du travail. Ces composés sont également utilisables dans le traitement des anomalies de la contraction utérine et les dysménorrhées.

10

Les composés selon l'invention sont également intéressants dans le cadre d'une thérapie substitutive pour les femmes ménopausées, pour l'induction d'un cycle artificiel dans la procréation assistée et dans le cadre d'un usage en tant qu'antihypertenseur.

15

Ces propriétés justifient leur application en thérapeutique et l'invention a particulièrement pour objet à titre de médicaments, les composés tels que définis ci-dessus dans un milieu pharmaceutiquement acceptable.

20

Les composés conformes à l'invention présentent par rapport aux hormones stéroïdes non substituées en particulier les avantages suivants :

une modification de leurs propriétés physico-chimiques, avec dissolution plus facile et régulière, meilleure solubilité,

- une action pharmacologique plus régulière, moins variable dans le temps et selon les individus

- l'obtention d'une accumulation sélective et/ou une délivrance de monoxyde d'azote dans les tissus qui possèdent des récepteurs stéroïdes
- une augmentation de l'activité due à l'activité synergique avec la molécule stéroïde au sein du même tissu ;

5 Les différentes formes pharmaceutiques et les voies d'administration peuvent être :

- pour un usage oromuqueux : des comprimés buccaux ou oromuqueux ou de tels comprimés à effet retard, une pâte ou un gel gingival, une tablette à mâcher, une gomme à mâcher, une pastille, une capsule oromuqueuse, des gouttes, gel, un spray en
- 10 pâte ou n'importe quelle forme d'administration adéquate,
- pour un usage oral : des cachets, capsules, tablettes, tablettes recouvertes, capsules gastrorésistantes ou granulés,
- pour un usage nasal : un spray nasal, une solution à inhalation nasale, des gouttes nasales ou n'importe quelle autre forme d'administration nasale,
- 15 - pour une utilisation vaginale : un gel endocervical, une poudre endocervicale, une poudre pour un gel endocervical, une tablette servant à une solution vaginale, une émulsion vaginale, une capsule vaginale, une crème vaginale, une mousse vaginale, un gel vaginal, une irrigation vaginale, une solution vaginale ou une suspension vaginale, une tablette vaginale, un tampon vaginal ou n'importe quel autre moyen pouvant être
- 20 retiré pour une administration vaginale ou cervicale (tel qu'un ruban imprégné),
- pour un usage sous-cutané : une administration intramusculaire ou sous-cutanée (incluant une infusion continue à l'aide d'une pompe) ou une administration intraveineuse telle qu'une solution, suspension ou émulsion,
- pour une utilisation topique ou transdermale : un timbre, une crème, poudre ou spray.

25

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter :

Exemple 1 : préparation de l'ester nitrique d'énol 3 pregna-3(4)5(6)diène-20one

30

La progestérone (une part de progestérone en poids) est dissoute dans un mélange de 5 volumes d'acétonitrile et de 2 volumes de tétrahydrofurane (THF) maintenu à 0°. Quand la réaction est complète, une solution d'acide paratoluène sulfonique à raison de 0,025 part dans 0,25 volume d'acétonitrile est ajoutée. Une solution d'acide nitrique à 65 % (1,1 mole d'acide nitrique par mole de progestérone)

dissoute dans 2 volumes d'acétonitrile est alors ajoutée. Après un temps de réaction d'approximativement 30 minutes, le produit est extrait avec le THF, la solution est concentrée par évaporation et cristallisée dans l'éther isopropylique.

On obtient le nitrate d'énol de progestérone de formule (I).

5

Exemple 2 : Préparation d'un dérivé nitrique de progestérone de formule (II)

La progestérone à raison d'1 part en poids est dissoute dans un mélange de 5 volumes d'acétonitrile et de 2 volumes de THF maintenu à 0°. Quand la réaction est complète, une solution d'acide paratoluène sulfonique à raison de 0,025 part dans 0,25 volume d'acétonitrile est ajoutée. Une solution de 4-nitroxy méthylbenzoate d'éthyle (1,1 mole par mole de progestérone) dissoute dans 2 volumes d'acétonitrile est ajoutée. Après un temps de réaction d'approximativement 30 minutes, le produit est extrait avec le THF, la solution est alors concentrée par évaporation et cristallisée dans l'isopropyléther.

15

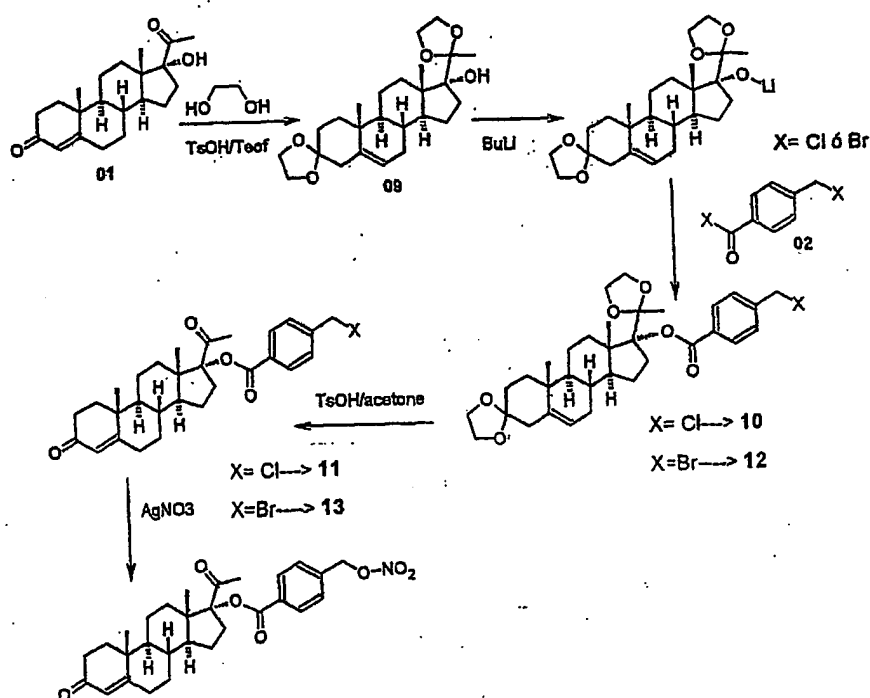
Exemple 3 : préparation de l'ester dinitrique de la 17 α -hydroxyprogestérone de formule (III)

La 17 α -hydroxyprogestérone à raison d'une part en poids est dissoute dans 2,25 volumes d'anhydride acétique (pur à au moins 98 %) maintenue à 0°C. Une solution de 2,5 % d'acide paratoluène sulfonique maintenue à 0 C dans 0,25 volume d'anhydride acétique est alors ajoutée. Le mélange est chauffé avec précaution à une température entre 0 et 20°. Une solution à 65 % de 4-nitroxyméthyl benzoate d'éthyle (1,1 mole par mole) dans 2 volumes d'acétonitrile est ajoutée. Le mélange est maintenu pendant une heure à 20° puis 0,05 part en poids de triéthylamine est ajoutée et le produit est mélangé à 10 parts d'un mélange eau + glace. Le produit est filtré et lavé puis resolubilisé dans du méthanol qui contient 10 % d'eau, acidifié avec de l'acide nitrique (0,9 mole par mole) et chauffé à reflux pendant 2 heures. Trois volumes de chlorure de méthylène sont ensuite ajoutés. Le produit est neutralisé, refroidi et extrait avec du chlorure de méthylène. Le chlorure de méthylène est alors éliminé et le produit est cristallisé dans du méthanol.

25
30

Exemple 4 : préparation du (4'-nitro.oxy-méthyl)-benzoate de 17 α hydroxy-pregn-4-ène-3,20-dione de formule (IV)

5 L'estérification en 17 s'effectue en accroissant la nucléophilie du groupe hydroxyle par l'intermédiaire de la formation de l'alcoxyde de lithium.



10 Dans ces conditions, après avoir obtenu l'ester 11 ou 13 il s'est avéré relativement facile de continuer à faire la réaction avec le nitrate d'argent pour l'obtention du composé décrit. Pour éviter les réactions latérales au cours de la formation d'alcoxyde il est nécessaire de protéger les groupes carbonyles à travers la formation de l'acétal correspondant.

15 Bien qu'il faille 3 étapes de synthèse supplémentaires, toutes les réactions se déroulent bien et avec de bons rendements, les intermédiaires étant facilement isolables et purifiables.

L'obtention du cétal 09 fut réalisée facilement par réaction avec l'éthylèneglycol en présence de TsOH (acide tosylique) comme catalyseur et triéthylorthoformiate comme agent déshydratant.

5 Le produit obtenu est un solide blanc facilement purifiable par recristallisation dans le méthanol.

Une fois purifié, on traite le produit dans le THF avec du BuLi (butyllithium) pour former l'alcoide et on le laisse réagir avec le chlorure d'acide correspondant (chlorure de l'acide 4chlorométhylbenzoïque ou bromure de 4bromométhylbenzoyle).

10 D'une manière inattendue, la réaction se fait finalement en 30 minutes, pour donner quantitativement le chloroester 10 ou le bromoester 12 de l'acétal.

15 Les composés 10 ou 12 s'hydrolysent facilement en cétone en présence de TsOH pour donner l'ester recherché 11 ou 13. Ces produits se présentent comme des solides blancs de grande pureté. Non seulement ils se purifient sur colonne chromatographique, mais aussi par recristallisation dans l'acétate d'éthyle.

Tous les produits intermédiaires ont été caractérisés par RMN et le produit final par RMN et spectrométrie de masse.

20

Exemple 5 : préparation de l'ester nitrique de l'estradiol de formule (VI)

25 Une part en poids d'acétate d'estradiol est dissoute dans 2 volumes de pyridine à 20°, du chlorure de nitrile (à raison d'1,2 mole par mole) est ajouté à 20°C et maintenu à cette température pendant 4 heures. Le produit est alors versé dans un mélange de 10 parts d'eau et de glace et à 2,5 volumes d'acide chlorhydrique 22° Baumé, mélangé à 0°C, lavé et séché. Le produit est placé dans du méthanol à reflux, 5 volumes, cristallisé dans le méthanol. Après séchage, l'estradiol portant en position 3 un groupement ester nitrique est obtenu avec un rendement de 88 %.

30

Exemple 6 : préparation d'un dérivé dinitrique d'estradiol de formule (V)

Une part en poids d'estradiol est dissoute dans un mélange de 5 volumes d'acétonitrile et de 2 volumes de THF et maintenue à 0°. Une solution de 0,025 part d'acide paratoluène sulfonique dans 0,25 volumes d'acétonitrile est alors ajoutée puis une solution d'acide nitrique à 65 % (2,5 moles par mole) dans deux volumes

d'acétonitrile et le mélange est laissé à réagir toute la nuit à 20°C. Le produit est extrait avec du chlorure de méthylène et cristallisé dans de l'éther isopropylique. Du dinitrate d'estradiol est obtenu.

5 Exemple 7 : préparation d'un dérivé nitrique de spironolactone de formule (VII)

0,116 part de sodium métal est ajouté à 4 volumes d'éthanol sous atmosphère d'azote à 20° et chauffé à reflux jusqu'à dissolution. Le mélange est refroidi à 30° et 1,288 part de malonate d'éthyle est ajouté, suivi par l'addition d'une part de diénoxirane. Le mélange est chauffé à reflux pendant 5 heures, refroidi et neutralisé
10 avec 0,3 volumes d'acide acétique puis on ajoute 5 volumes d'eau. Le précipité est filtré, lavé et séché. Le carbaldiène est obtenu avec un rendement estimé de 85 %. Une solution est préparée avec une part de carbaldiène, 1,28 part de 3-hydroxybenzylnitrate, 0,75 part de dicyclohexyl carbodiimide et 20 volumes de dichlorométhane. Cette solution est laissée une nuit à 20°. Ensuite, les solvants sont concentrés, le
15 dicyclohexylurée est éliminé par filtration et le produit est cristallisé dans l'éthanol. Le nitrate de carboxydiène est obtenu avec un rendement estimé de 80 %.

Le nitrate de carboxydiène est alors dissous dans 3,5 volumes d'éthanol, et 0,4 part d'acide thioacétique est ajouté. La solution est chauffée à reflux pendant 3 heures puis refroidie à 0° pendant une heure. Le produit est alors séché. La spironolactone de
20 formule (VII) est obtenue avec un rendement estimé de 94%.

Exemple 8 : Inhibition *in vitro* de la contractilité utérine de fibres de myomètre d'utérus de femmes non gestantes

25 L'activité contractile de fragments de myomètres humains a été étudiée *in vitro*.

Après un temps de latence d'environ deux heures, permettant l'établissement de contraction spontanées, l'inhibition des contractions produite par l'addition dans le milieu de 17- α hydroxyprogestérone et de son dérivé nitré, (4'-nitro.oxy-méthyl)-
30 benzoate de 17 α hydroxy-pregn-4-ène-3,20-dione, identifié dans ce tableau sous le nom de (4'-nitro.oxy-méthyl)-benzoate de 17 α hydroxy-pregn-4-ène-3,20-dione (exemple 4) a pu être mesurée.
Cette expérience permet d'évaluer l'effet à court terme de ce composé.

35 Les résultats sont présentés dans le tableau I :

		PRODUIT			
		(4'-nitro.oxy-méthyl)-benzoate de 17 α hydroxy-pregn-4-ène-3,20-dione		17 α hydroxy progestérone	
		Concentration	Moyenne	Déviati on standard	Moyenne Déviati on standard
Inhibition en %	2 10 ⁻⁷ M		37	14	45 26
	2 10 ⁻⁶ M		69	6	66 29

5

Le dérivé nitré, (4'-nitro.oxy-méthyl)-benzoate de 17 α hydroxy-pregn-4-ène-3,20-dione, possède en moyenne la même activité que l'hydroxyprogestérone, mais son action est beaucoup plus constante, moins variable.

10

Exemple 9 : Inhibition *in vitro* de la contractilité utérine spontanée ou induite dans des utérus de rates non gestantes

Des femelles Old Wistar intactes âgées de 90 jours, pesant de 180 à 200 g, sont tuées par décapitation le lendemain du jour II du diestrous. Leur utérus entier non nettoyé est retiré et placé dans une solution de Kreb's Ringer modifiée (tampon contrôle à 2% de diméthylsulfoxyde) à 37°. Le tissu est nettoyé de la graisse et du fascia qui l'enveloppent, et coupé en petits anneaux de 5 mm. Ces anneaux sont attachés à un transducteur de déplacement de force sous une tension de 1gramme. Le tissu est laissé pendant une période d'équilibration de 30 minutes afin de laisser se développer les contractions. Le tampon contrôle est remplacé par un tampon qui contient le produit à tester (exemple 1 à 3) ou la progestérone seule en présence ou non de l'antagoniste du récepteur picrotoxine (32 μ g/ml) ou le mifepristone (RU-486).

Différentes concentrations du produit testé sont utilisées pour comparer les effets utéro-relaxants du produit-test aux effets de la progestérone seule. Aucun anneau de tissu n'est utilisé dans plus d'une expérience contrôle-test. La tension pour chaque type d'expérience est mesurée pendant une période de 10 mn. Les contractions utérines

25

sont analysées en tension totale générée en gramme de tension par gramme de tissu. Cette étude a pour but de montrer l'activité utéro-relaxante du produit testé.

5 Exemple 10 : Inhibition *in vitro* de la contractilité utérine spontanée et induite dans des utérus de cobayes gestantes

Le but est de mesurer l'action du produit-test sur des contractions utérines induites par l'oxytocine.

10 Des cobayes matures au 20^e jour de gestation sont utilisés. Un segment utérin de 10 mm est retiré et suspendu à un système de levier (1g) dans un bain organique contenant 35 ml de solution physiologique (Van Dyke-Hasting) maintenu à 37° et continuellement bullé avec O₂CO₂.

15 Les contractions sont induites par l'oxytocine à la concentration de 10⁻⁴ moles/ml. Les contractions sont mesurées avec un transducteur linéaire couplé à un enregistreur. L'addition du produit-test à différentes concentrations montre l'action utéro-relaxante que les contractions de l'utérus en gestation soient spontanées ou induites. L'action de ces produits est également comparée à l'action de la progestérone.

20 Exemple 11 : Mesure *in situ* de la contractilité et de la pression artérielle dans des utérus complets

La contractilité utérine est évaluée par la mesure des changements de pression artérielle dans un utérus perfusé par une canule *in situ*. Les changements de la pression artérielle sont également déterminés. La mesure de la vitesse du sang artériel utérin reflète en effet la perfusion de cet organe.

25 Cinq femelles vierges de cobaye Hartley sont anesthésiées le jour 1 de leur oestrus (c'est-à-dire le premier jour de l'ouverture du vagin) avec du pentobarbital sodium à la concentration de 35 mg/kg. La veine jugulaire externe est canulée pour une administration de produit à tester et l'artère carotide est également canulée pour enregistrer la pression artérielle. L'utérus est exposé par une incision médiane abdomino-péritonéale. Une première canule est insérée à la jonction uterotubale et une
30 deuxième canule est insérée à travers le col de l'utérus dans l'utérus et est fixée. Le liquide de perfusion (de l'eau distillée à température ambiante) est perfusé à la vitesse de 0,5 ml/mn à travers la canule de la jonction uterotubale et est collecté à partir de la canule présente dans le col de l'utérus. Le produit testé est administré et comparé à la progestérone. Les modifications de la pression de la perfusion utérine sont enregistrées

avec des transducteurs de pression Beckman couplés à un enregistreur. Les réponses dans le tonus utérin sont quantifiées en termes de millimètres de pression de mercure. Les modifications de la pression artérielle sont également enregistrées.

5 Exemple 12 : Mesure *in vivo* de la vitesse sanguine artérielle utérine et de la pression systémique dans des rates gestantes.

Des rates Wistar gestantes sont anesthésiées et ventilées de façon mécanique avec un ventilateur pour petits rongeurs. La température du corps est maintenue à 37°. La veine jugulaire est canulée pour l'injection de produits à tester et la pression
10 systémique est enregistrée à partir de l'artère carotide gauche. L'utérus est alors exposé et maintenu humide par une solution physiologique. La rapidité artérielle utérine principale est mesurée par un Doppler.

L'administration du produit permet la mesure de l'influence des contractions utérines spontanées ou induites par la phényléphrine et également de mesurer la
15 pression systémique. Ce test peut également être utilisé dans des études comparatives avec d'autres produits capables de relaxer l'utérus comme la progestérone seule, des donneurs de NO ou des antagonistes adrénergiques, comme par exemple la ritodrine.

20 Exemple 13 : Action *in vivo* des produits selon l'invention sur le travail de rates gestantes.

La capacité des traitements par ces drogues à retarder le début du travail est évaluée dans un modèle qui mesure le temps de délivrance spontanée entre le premier et le second raton à naître dans une grossesse à terme.

Des femelles gestantes sont placées dans des cages individuelles en plastique à partir des jours 16 à 19 de grossesse. A partir du jour 22, les femelles sont observées de
25 façon continue. Immédiatement à la délivrance du premier raton, les femelles reçoivent le produit à tester. Le temps de délivrance du premier raton est enregistré puis la femelle est placée dans sa cage et observée jusqu'à la délivrance du second raton. Les résultats sont exprimés en temps passé entre les première et la deuxième délivrances.

Les produits administrés sont soit le produit objet de l'invention, soit la
30 progestérone seule, soit la ritodrine ou soit un placebo afin de comparer les effets de ces différents produits.

Exemple 14 : Action in vivo sur la maturation cervicale utérine dans des rates gestantes.

Le but est de mesurer la maturation cervicale de rates femelles adultes. Ces rates gestantes en fin de grossesse présentant une maturation cervicale spontanée ou induite sont traitées avec le produit-test, la progestérone seule ou le placebo administrés de façon vaginale. Les mesures de temps pour terminer la délivrance, la force nécessaire pour dilater le col de l'utérus et le temps pour obtenir la dilatation sont enregistrés.

Exemple 15 : Traitement de la menace d'accouchement prématuré chez la femme

a) par injection :

Une solution contenant un des composés des exemples 1 à 4 (dérivés de la progestérone et de la 17- hydroxyprogestérone) est reconstituée extemporanément et infusée par voie sous-cutanée, grâce à un cathéter inséré sous la peau et à l'utilisation d'une pompe à la dose initiale de 1 mg à 10 mg par heure, selon l'intensité des contractions. Cette dose peut être très progressivement augmentée si besoin sous surveillance constante de la pression artérielle. Lorsqu'une diminution de la fréquence des contractions est obtenue, le dosage peut être très progressivement diminué.

Une solution contenant un des composés des exemples 1 à 4 (dérivés de la progestérone et de la 17- hydroxyprogestérone) est injectée par voie sous-cutanée, en injection régulièrement espacées. L'utilisation des procédés habituellement utilisés en galénique peut permettre de réaliser des formes retard permettant une diffusion contrôlée, plus lente et plus prolongée du principe actif.

b) par l'ingestion d'un comprimé

Un comprimé sublingual contenant un des composés des exemples 1 à 4 est placé sous la langue sans être avalé ni croqué. Le dosage initial est de 3 mg. La prise peut être répétée deux fois, à une heure d'intervalle (9 mg en 2 heures au total), sous surveillance continue de la pression artérielle. Les prises seront ensuite répétées toutes les 8 heures pendant une durée de 48 heures.

c) par un gel intranasal

Un gel aqueux contenant un des composés des exemples 1 à 4, dosé à 5 mg par dose unitaire, est appliqué dans une narine. Cette dose peut être répétée trois heures plus tard, sous surveillance continue de la pression artérielle. Les applications sont ensuite répétées toutes les 8 heures pendant une durée de 48 heures.

5

d) par gel intravaginal

Un gel contenant un des composés des exemples 1 à 4, est inséré dans la cavité vaginale. Le dosage initial est de 10 à 200 mg de principe actif, sous surveillance continue de la pression artérielle. Une deuxième administration sera effectuée de 6 à 24 heures plus tard.

10

15

REVENDICATIONS

1. Composé caractérisé par le fait qu'il est choisi parmi les composés capables de se fixer à des récepteurs d'hormones et qu'il comporte un groupement ester nitrique donneur de monoxyde d'azote à l'exception de l'estradiol substitué en position 11 et/ou 17 par un groupement ester nitrique.
- 5 2. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que les récepteurs d'hormone sont choisis parmi des récepteurs stéroïdes, rétinoides et de dérivés de la vitamine D.
3. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé par le fait que le composé capable de se fixer à des récepteurs d'hormones est une hormone naturelle.
- 10 4. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé par le fait que le composé capable de se fixer à des récepteurs d'hormones est une hormone synthétique.
5. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que l'hormone capable de se fixer à des récepteurs d'hormones est choisie dans le groupe composé d'une hormone progestative, d'un œstrogène, d'un anti-minéralocorticoïde, d'un androgène ou d'un anti-androgène ou d'une combinaison de ces hormones.
- 15 6. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé par le fait que l'hormone capable de se fixer à des récepteurs d'hormones est choisie dans le groupe suivant : progestérone, 17OH progestérone, estradiol, éthinyl estradiol, aldostérone, spironolactone, drospirénone, testostérone, cyprotérone.
- 20 7. Composé selon la revendication 1 à 6, caractérisé par le fait qu'il comporte un ou plusieurs groupements NO_2 lié(s) à l'hormone directement par l'atome d'oxygène de la forme énolique ou par l'intermédiaire d'un radical benzyloxy.
- 25 8. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé par le fait que le ou les groupements NO_2 sont liés directement à l'hormone par l'atome d'oxygène de la forme énolique de celle-ci.
- 30 9. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé par le fait que le ou les groupements NO_2 sont liés à l'hormone par l'intermédiaire d'un radical benzyloxy.

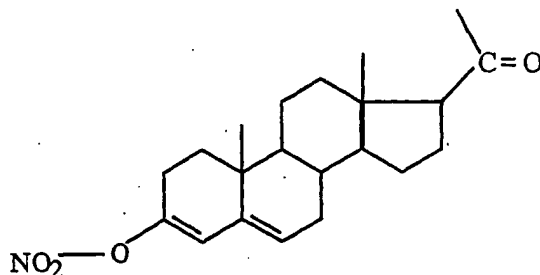
10. Composé selon la revendication 9, caractérisé par le fait que le radical benzyloxy est lié à l'hormone par l'intermédiaire d'un groupement établissant un pont.

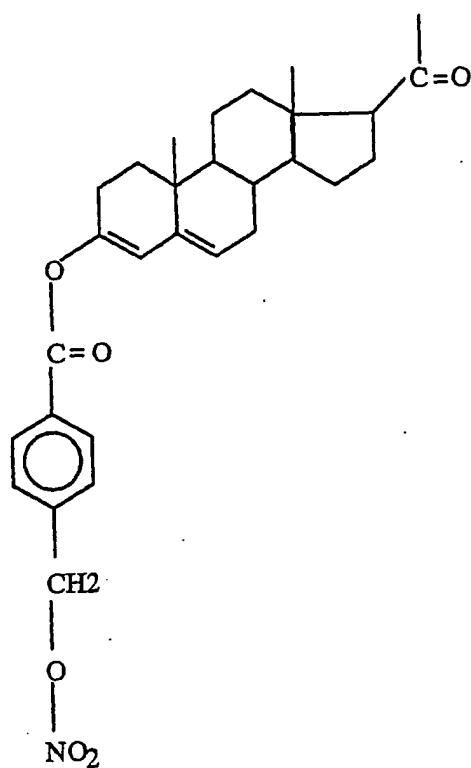
5 11. Composé selon la revendication 10, caractérisé par le fait que le pont est un C=O ou COO.

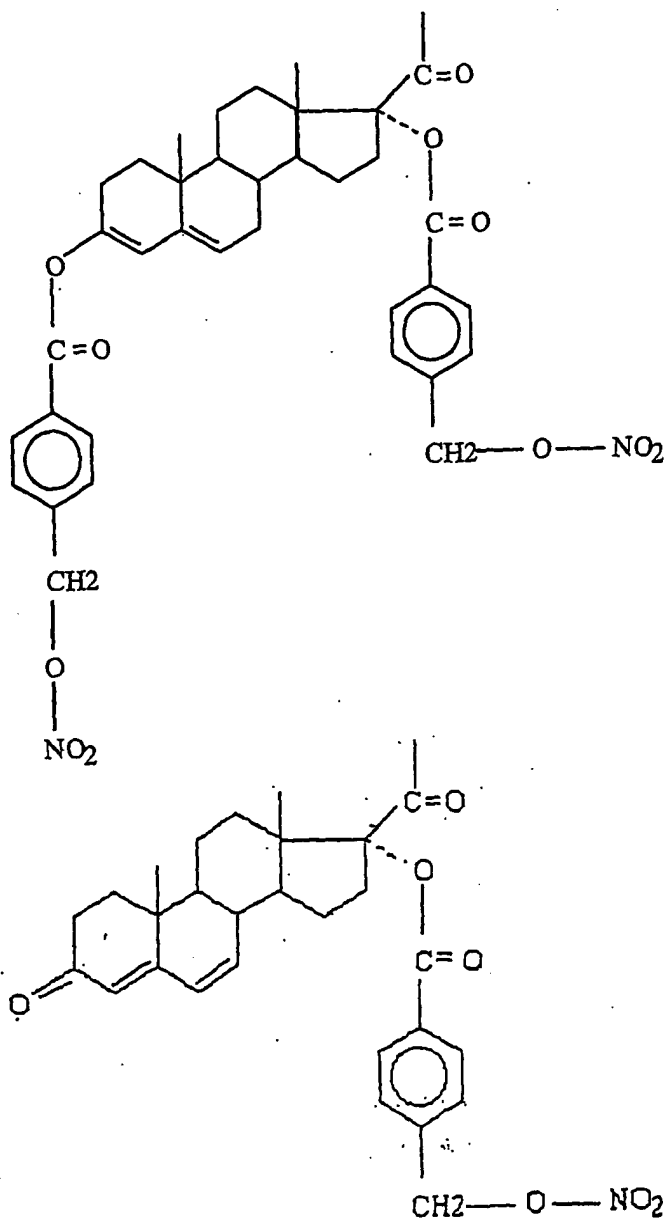
12. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé par le fait que l'hormone capable de se fixer à des récepteurs d'hormones est la progestérone.

10 13. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé par le fait que l'hormone capable de se fixer à des récepteurs d'hormones est la 17OH progestérone.

14. Composés selon la revendication 7, caractérisés par le fait qu'ils répondent aux formules :







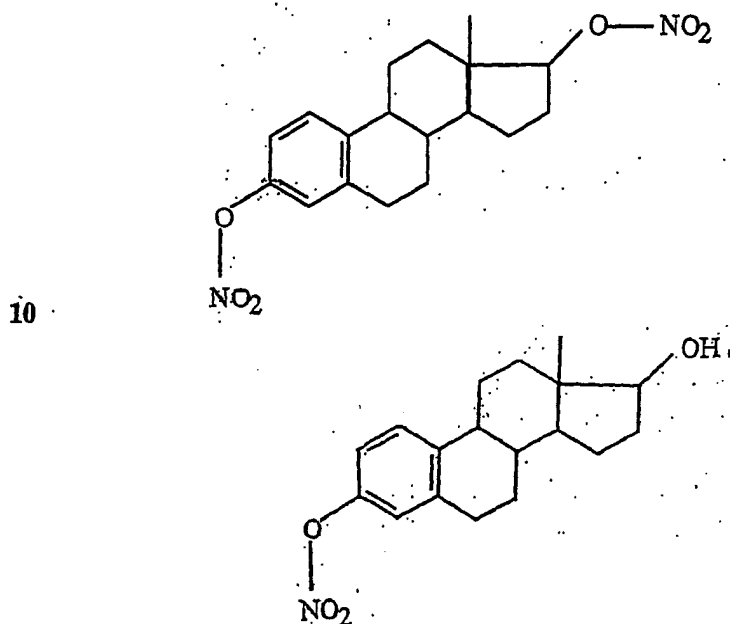
5

15. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé par le fait que l'hormone capable de se fixer à des récepteurs d'hormones est l'estradiol.

16. Composé selon la revendication 15, caractérisé par le fait qu'il est substitué en position 17 et 3 de l'estradiol par un groupement NO_2 lié à l'atome d'oxygène de la fonction OH de l'estradiol.

5 17. Composé selon la revendication 15, caractérisé par le fait qu'il est substitué en position 3 de l'estradiol par un groupement NO_2 lié à l'atome d'oxygène de la fonction OH de l'estradiol.

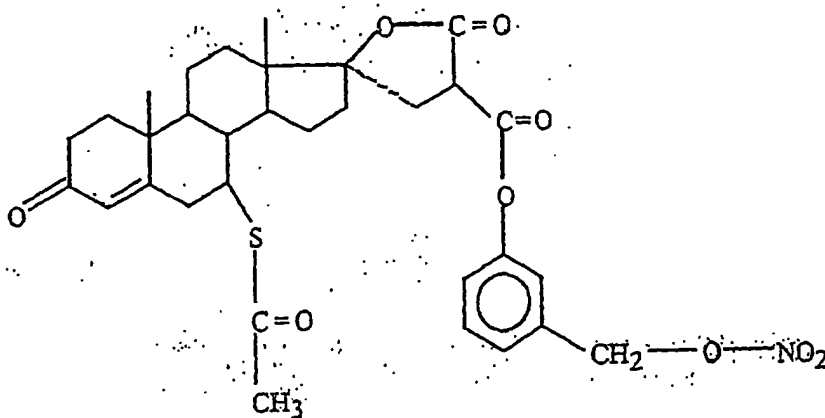
18. Composés selon la revendication 16 ou 17, caractérisés par le fait qu'ils répondent aux formules



15 19. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé par le fait que l'hormone capable de se fixer à des récepteurs d'hormones est la spironolactone.

20. Composé selon la revendication 19, caractérisé par le fait qu'il comporte un groupement NO_2 lié par l'intermédiaire d'un radical benzyloxy.

20 21. Composé selon la revendication 20, caractérisé par le fait qu'il répond à la formule



22. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 21 pour son application comme médicament.

5 23. Composition pharmaceutique caractérisée par le fait qu'elle comprend dans un milieu pharmaceutiquement acceptable, un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 21.

24. Médicament caractérisé par le fait qu'il contient au moins un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 21 dans la prévention des naissances prématurées.

10 25. Médicament selon la revendication 24 pour son application thérapeutique dans la prévention des naissances prématurées.

26. Médicament selon la revendication 24 pour son application thérapeutique dans le contrôle de la mobilité utérine.

15 27. Médicament selon la revendication 24 pour son application thérapeutique dans l'augmentation de la dilatation cervicale lors de l'étape du travail.

28. Médicament selon la revendication 24 pour son application thérapeutique dans le traitement des anomalies de la contraction utérine.

20 29. Médicament selon la revendication 24 pour son application thérapeutique dans le traitement des dysménorrhées.

30. Médicament selon la revendication 24 pour son application thérapeutique dans le traitement hormonal de substitution des femmes ménopausées.

25 31. Médicament selon la revendication 24 pour son application thérapeutique dans l'induction d'un cycle endométrial dans le cadre de la procréation assistée.

32. Médicament selon la revendication 24 pour son application thérapeutique dans la prévention ou le traitement de l'hypertension artérielle.

5 33. Utilisation d'un composé caractérisé par le fait qu'il est capable de se fixer à des récepteurs d'hormones et qu'il comporte un groupement ester nitrique donneur de monoxyde d'azote pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention des naissances prématurées

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/02152

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07J41/00 A61K31/565 A61P15/04 A61P15/06 A61P15/12
A61P9/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07J A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 3 052 675 A (ANTOINE LOCATELLI ET AL) 4 September 1962 (1962-09-04) column 10; example I ---	1,2,4,5, 23-32
X	US 3 494 941 A (LEDIG KURT W ET AL) 10 February 1970 (1970-02-10) column 8, line 35-42 column 7, line 35 - line 55 ---	1-3,5-8
X	US 3 352 891 A (LEDIG KURT W ET AL) 14 November 1967 (1967-11-14) column 1, line 53-56; claims 1-10 ---	1,2,4,5, 23-32
X	DE 16 43 034 A (SCHERING AG) 6 May 1971 (1971-05-06) page 3, paragraph 2; claims 3-17 --- -/--	1-8,12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 December 2003

Date of mailing of the international search report

23/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Trifilieff-Riolo, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 03/02152

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB 1 446 126 A (RES INST FOR MEDICINE CHEMISTR) 18 August 1976 (1976-08-18) page 8, line 49 page 3, line 24 - line 28 examples 1,2,4-8,10,1,13-16 -----	1-3, 5, 6, 12
A	WO 98 09948 A (NICOX SA ;DEL SOLDATO PIERO (IT); SANNICOLO FRANCESCO (IT)) 12 March 1998 (1998-03-12) cited in the application page 42, line 14-18 -----	1-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 03/02152

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplementary sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 03/02152

Continuation of Box I.2

Claims 1 to 11 and 22 to 33 of the present application relate to a very wide variety of compounds (and medicines containing same). However, a support basis within the meaning of PCT Article 6 and/or a disclosure within the meaning of PCT Article 5 can be found for only a very limited number of said claimed compounds (and medicines containing same). In the present case, the claims are so lacking in support basis and the disclosure of the invention in the description is so limited that it is not possible to carry out any meaningful search covering the whole claimed spectrum. Consequently, the search was limited to those parts of the claims which are supported and sufficiently disclosed, that is those parts relating to compounds described in Claims 12 to 21 (and medicines containing same).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/FR 03/02152

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 3052675	A	04-09-1962	NONE
US 3494941	A	10-02-1970	NONE
US 3352891	A	14-11-1967	US 3394150 A 23-07-1968 FR 6446 M 12-11-1968 FR 1510799 A 19-01-1968 GB 1156422 A 25-06-1969 US 3452061 A 24-06-1969
DE 1643034	A	06-05-1971	DE 1643034 A1 06-05-1971
GB 1446126	A	18-08-1976	AU 490361 B2 20-11-1975 US 3930970 A 06-01-1976 AU 6903074 A 20-11-1975 DE 2424211 A1 27-11-1975
WO 9809948	A	12-03-1998	IT MI961821 A1 04-03-1998 AU 729533 B2 01-02-2001 AU 4301097 A 26-03-1998 BR 9712008 A 24-08-1999 CN 1234792 A 10-11-1999 WO 9809948 A2 12-03-1998 EP 0931065 A2 28-07-1999 JP 2000517332 T 26-12-2000 RU 2210563 C2 20-08-2003